

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性疾患の画期的診断・治療等に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成19年 (2007) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究
国立精神・神経センター研究所 疾病研究第六部 山村 隆 -----1

II. 分担研究報告

- MS 寛解期ナチュラルキラー細胞 CD11c 発現量と疾患活動性に関する研究
国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部 山村 隆 -----9
- MS 再発寛解期の末梢血 T リンパ球で発現差異を呈する遺伝子群の
分子ネットワーク解析
明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス 佐藤 準一 ----- 13
- 「多発性硬化症における Nurr1 の関与」に関する研究
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 三宅幸子 ----- 22
- インターフェロン・ベータ 1b 療法中止後の多発性硬化症治療について
国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 小川 雅文 ----- 27
- 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いた新たなヒト *in vitro* BBB model の確立
山口大学大学院医学研究科脳神経病態学神経内科学分野 神田 隆 ----- 29
- 「実験的自己免疫性脳脊髄炎の中樞神経におけるaquaporin-4の検討」に関する研究
近畿大学医学部神経内科 楠 進----- 35
- 食事性脂質と NKT, T 細胞機能に関する研究
国立病院機構札幌南病院神経内科 菊地誠志 ----- 36

| | |
|---|----------|
| ■ ヒト肥満細胞と樹状細胞に対する I 型 IFN の免疫制御的作用 | |
| 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 堀 利行 ----- | 38 |
| ■ 外傷をきっかけにした白質病変 | |
| 東京理科大学理学部 太田 宏平 ----- | 43 |
| ■ arundic acid (ONO-2506) による慢性進行型・再発寛解型 EAE の抑制 臨床経過および病理組織学的検討 | |
| 埼玉医科大学総合医療センター 野村恭一 ----- | 46 |
| ■ 日本における随意運動障害(movement disorder)を呈する多発性硬化症の特徴及びインターフェロンの効果に関する研究 | |
| 順天堂大学医学部脳神経内科神経免疫部門 横山 和正 ----- | 51 |
| ■ インターフェロンと NK 細胞 | |
| 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部臨床免疫研究室 小笠原康悦 ----- | 54 |
| | |
| III. 班員名簿 | ----- 58 |
| | |
| IV. 平成 18 年度班会議プログラム | ----- 59 |
| | |
| V. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 81 |
| | |
| VI. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 85 |

I. 総括研究報告

難治性疾患の画期的診断・治療等に関する研究

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所

疾病研究第六部 部長

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系の自己免疫疾患である。急性期にはステロイド・パルス療法、慢性期にはインターフェロン療法が推奨されているが、その適用については主治医の判断によるところが大きく、個々の症例では過剰または不十分な治療になっている可能性が排除できない。その理由として、他の多くの内科疾患の診療で利用できる血液バイオマーカーが MS においては存在しないことが上げられる。本研究では、MS の病態を正確に把握するバイオマーカーを同定し、MS の診療レベルを向上することを一義的な目標としている。平行して MS 病態に関連する免疫異常を同定する DNA マイクロアレイを用いた研究や、既存の治療薬の処方までを至適化する研究も進めている。本年度は、MS の患者末梢血 NK 細胞の CD11c 分子発現量が、MS の予後を推定する良いマーカーとなることを明らかにした (Aranami, Miyake, Yamamura. *J. Immunol.* 177: 5659, 2006)。すなわち、寛解期の MS では CD11c の高いグループ (CD11c high) と低いグループ (CD11c low) に分かち、CD11c high では 4 ヶ月以内に再発を来す確率が有意に高いことを示した。また、MS の再発期に特異的な T 細胞遺伝子発現パターンを同定し、MS 再発時には NF- κ B 遺伝子発現制御系の異常の存在することを確認した。また前年度までに MS の T 細胞で転写因子 NR4A2 の発現が亢進していることを明らかにしたが (Sato et al. *Neurobiol. Dis.* 18:537, 2005)、NR4A2 には炎症性サイトカイン IL-17 やインターフェロン・ガンマの T 細胞産生を誘導する活性があることなどを明らかにした。一連の研究成果は、MS の病態解明に関して国際的にも誇るべき成果であると同時に、新たな診断技術や治療薬開発につながるものである。

分担研究者

| | | | |
|------|----------------------------------|------|-----------------------------|
| | | 楠 進 | 近畿大学医学部神経内科 教授 |
| | | 菊地誠志 | 国立病院機構札幌南病院 神経内科 部長 |
| 佐藤準一 | 明治薬科大学薬学部 生命創薬科学科 教授 | 堀 利行 | 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 講師 |
| 三宅幸子 | 国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部 室長 | 太田宏平 | 東京理科大学理学部 教授 |
| 小川雅文 | 国立精神・神経センター 武蔵病院神経内科 医長 | 野村恭一 | 埼玉医科大学総合医療センター 教授 |
| 神田 隆 | 山口大学大学院医学研究科脳神 経病態学神経内科学分野 教授 | 横山和正 | 順天堂大学医学部脳神経内科 講師 |

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系の自己免疫疾患である。従来インターフェロン・ガンマ (IFN- γ) を産生する Th1 細胞の関与が強調されてきたが、最近では IL-17 を産生する Th17 細胞に強い炎症惹起能の存在することが示され、Th1 および Th17 の関与する疾患と考えられるようになってきている。MS の回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。急性期にはステロイド・パルス療法、慢性期にはインターフェロン療法が推奨されている。しかし、その適応については主治医の判断によるところが大きく、個々の症例では過剰または不十分な治療になっている可能性が排除できない。その理由として、他の多くの内科疾患の診療で利用できる血液バイオマーカーが MS においては存在しないことが上げられる。本研究では、MS の病態を正確に把握し予後の推定にも有用なバイオマーカーを同定し、MS の診療レベルを向上させることを一義的な目標としている。平行して MS 病態に関連する免疫異常を同定する DNA マイクロアレイを用いた研究、既存の治療薬の処方至適化する研究も進めている。

B. 研究方法

B-1: NK 細胞 CD11c のバイオマーカーとしての有用性に関する研究

健常者 10 例と再発寛解型 MS 患者 25 例の末梢血単核球を用いた。全ての患者は、採血の

時点で最低 1 ヶ月間、ステロイドまたは IFN- β 投与を受けていないことを条件とした。T 細胞、NK 細胞表面分子 (CD11c など) の発現をフローサイトメトリーにより測定し、採血より 120 日間の患者の臨床経過を追跡し、Kaplan-Meier の生存率に倣い寛解率を算出した。統計学的検定は、Logrank テストで行った。

CD11c 発現上昇のメカニズムを明らかにするため、健常者の精製 NK 細胞を様々なサイトカイン存在下で 3 日間培養し、CD11c 発現量を解析した。また、健常者、MS 患者それぞれから末梢血 NK 細胞を磁気ビーズで分離し、定量的 RT-PCR 法により、IFN- γ 、IL-5 発現量を定量、Type2 NK 細胞偏倚を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立精神・神経センター倫理委員会の承認を受け、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で行った。また、患者から得られた情報は、当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

B-2: 再発特異的な T 細胞遺伝子発現パターンの同定に関する研究

武蔵病院神経内科の 6 名の再発寛解型 MS 患者で、急性増悪期(acute relapse)と完全寛解期 (remission)に末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を採取、MACS で CD3⁺ T 細胞を分離、RNA を精製、cDNA microarray (1258 genes; Hitachi Life Science)を用いて、遺伝子発現プロファイルを比較解析した。再発期サンプルと寛解期サンプルの 2 群における個々の遺伝子発現レベル差異を Student t-test で検定し、再発に特異的な遺伝子変化 relapse-specific genes (RSG)を抽出した。生物情報統合プラットフォーム

オーム KeyMolnet(医薬分子設計研究所)を用いて、43 個の RSG の分子ネットワークを、周辺検索法(neighboring search)および共通上流検索法(common upstream search)で解析した。

(倫理面への配慮)

「多発性硬化症患者および対照リンパ球遺伝子発現解析研究(申請者山村隆)」は、既に国立精神・神経センター倫理委員会で承認済みである。本研究で解析する患者全員から研究参加に関して文書で同意を取得した。

B-3: NR4A2 の機能に関する研究

MS 末梢血 T 細胞と健常人末梢血 T 細胞における NR4A2 (Nurr1) の発現を real-time PCR 法を用いて検討した。実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) は、C57/BL6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを用いて誘導した。脳脊髄(CNS)浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離し real-time PCR を用いて NR4A2 の発現レベルを比較した。CNS 浸潤 T 細胞のサイトカイン産生を ELISA 法ならびに細胞内 IL-17 染色法を用いて調べた。T 細胞株に NR4A2 を過剰発現させ、炎症性サイトカインである IL-17、IFN- γ および IL-2 のリポーターアッセイを行った。ヒト CD4 T 細胞に NR4A2 の siRNA を導入し、抗 CD3 抗体刺激により産生されるサイトカインを ELISA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

採血に当たっては、ドナーに対して十分な説明を行った後、書面により同意を確認した。また個人情報保護についても十分な配慮を払った。動物実験は当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

B-4: その他

分担研究報告書に記載。

C. 研究結果

C-1: NK 細胞 CD11c のバイオマーカーとしての有用性に関する研究

(1) MS 寛解期の NK 細胞では、健常者に比べ、CD11c 発現量(平均蛍光強度、MFI)の有意な増加が認められた。健常者 MFI の(平均値+2x 標準偏差)を正常上限とすると、寛解期 MS 患者は CD11c low および CD11c high に分けられた。

(2) 代表的細胞活性化マーカーである HLA-DR 発現を解析したところ、CD11c high MS の NK 細胞では、健常者または CD11c low MS の NK 細胞に比べて、有意な発現増強が認められた。

(3) MS の疾患活動性との関連が示唆される種々のサイトカインのうち、IL-15 あるいは IL-12+IL-18 のみが、NK 細胞 CD11c の有意な発現上昇を誘導した。

(4) CD11c low MS の NK 細胞では、Type2 NK 細胞偏倚(GATA-3 と IL-5 の過剰発現)が認められたが、CD11c high MS では、認められなかった。

(5) CD11c high MS は、4ヶ月間の寛解率が、CD11c low MS に比べ有意に低いことが判明した。

(6) 寛解期に発現が上昇した CD11c は、再発時には有意に低下しており、NK 細胞 CD11c が MS の病態に従ってダイナミックに変動することが示唆された。

C-2: MS 再発に特異的な T 細胞遺伝子発現パターンの同定に関する研究

(1) 再発期 vs 寛解期サンプルの群間検定($p < 0.05$)で 43 遺伝子(RSG)の発現差異(再発期に上昇 18 遺伝子; 再発期に低下 25 遺伝子)を認めた。

(2) 43 個の RSG を指標(discriminator)とした

階層的クラスター解析で、再発期サンプルと寛解期サンプルを独立したクラスターに分離することが出来た。

(3)KeyMolnet で43 RSG から88 core contents を抽出し、分子ネットワーク解析を施行した。共通上流検索と周辺検索の両方で、再発における NF- κ B 発現制御系の関与が最も有意と判定された。

C-3: NR4A2 の機能に関する研究

MS と健常人末梢血 T 細胞における NR4A2 発現を real-time PCR 法で検討し、MS で有意に上昇していることを確認した。

EAE を誘導し、CNS 浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離した。real-time PCR を用いて NR4A2 の発現レベルを比較すると、CNS 浸潤 T 細胞において特異的に上昇していた。細胞内染色法による検討では、CNS 浸潤 T 細胞では IL-17 産生細胞が優位であった。そこで、NR4A2 の IL-17 産生に与える影響を検討した。T 細胞株を用いてリポーターアッセイの結果、NR4A2 の過剰発現は IL-17、IFN- γ 、IL-2 の産生を増強させることがわかった。マウス CD4 T 細胞に、NR4A2 の siRNA を導入してその機能を抑制すると、抗 CD3 抗体刺激により産生される IL-17、IFN- γ 、IL-2 の産生が低下した。以上から、MS 患者の T 細胞で亢進の見られた NR4A2 は炎症の増強や維持に関係している可能性が推測された。

C-4: その他

分担研究報告書に記載。

D. 考察

MS の臨床においては、ステロイド剤やイン

ターフェロン、免疫抑制剤の有効性が示唆されているが、病態を客観的に把握するマーカーが存在しないために、投与開始時期、投与量などの決定は主治医の主観的な判断によっている。過剰の投薬は薬剤副作用を引き起こすだけでなく医療費高騰の原因ともなるので好ましくないが、不十分な投薬も患者の予後を悪化させるものであり容認できない。糖尿病診療における血糖値、あるいは感染症における CRP のような良い MS の病態マーカー（バイオマーカー）の確立が望まれている。

本年度の大きな研究成果は、患者末梢血 NK 細胞の CD11c 分子発現量が、MS の病態マーカーになり得ることを示したことである。CD11c の量が健常者と同程度の患者では、病状が安定しており、4 ヶ月以内に再発を起こした例は 15%にとどまった。一方、CD11c 量の高い患者（CD11c high）では、その 60%が 4 ヶ月以内に再発した。CD11c high の患者では、T 細胞が活性化抗原を強く発現し、NK 細胞の NK2 偏倚が消失していた。さらに、NK 細胞に作用する炎症性サイトカイン（IL-15 など）が CD11c 発現を亢進させることも証明できたので、CD11c は MS の免疫病態の活動性を反映する良い指標であると考えられる。

CD11c の検査は、基本的にはフローサイトメーターの利用できる施設であれば可能なので、測定方法や血液処理法などを標準化して全国の専門施設に普及させたいと考えている。なお、この研究に対する MS 患者や家族の期待は高く、論文が米国免疫学会誌に掲載された後、ただちに朝日、毎日、日経などの新聞が研究内容を報道した。

末梢血 T 細胞を DNA マイクロアレイで解析する研究では、前年度までに MS 患者で恒常的に発現の亢進している遺伝子を複数同定した

(Sato et al. *Neurobiol. Dis.* 18:537, 2005)。その中で、転写因子 NR4A2 に焦点を絞って研究を進めたところ、同分子が MS の動物モデル EAE の脳内浸潤細胞で特異的に発現亢進していることを見いだした (論文準備中)。さらに NR4A2 が種々の炎症性サイトカイン産生に決定的な役割を果たすことを、レポーターアッセイや siRNA による阻害実験によって証明できた。この予想外の結果は、NR4A2 が新しい治療標的分子になり得ることを意味している (特許出願済み)。

DNA マイクロアレイ検査で、再発期と寛解期を比較したところ、両群の間で有意な発現レベルの差を認める 43 遺伝子からなる遺伝子群 (RSG) を同定した。43 個の RSG は MS 再発をモニターするバイオマーカーとなり得る。また、RSG の分子ネットワーク解析により、NF- κ B 遺伝子発現制御系異常の MS 再発への関与が示唆された。NF- κ B は TNF α , IL-1 など炎症性サイトカイン発現制御で中心的役割を果たす転写因子である。一方 TNF α , IL-1 は NF- κ B の発現上昇を誘導し、positive feedback loop を形成して炎症を遷延化させる。現在まで 150 種類以上の遺伝子が NF- κ B ターゲットとして同定されている。既に NF- κ B の選択的阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate の投与 (Pahan et al. *Neurosci Lett* 287: 17-20, 2000) や脳特異的 NF- κ B 発現抑制 (Van Loo et al. *Nature Immunol* 7: 954-961, 2006) は MS の動物モデル EAE を軽症化することが報告されている。今回の研究結果は、NF- κ B 制御を適正化する分子が MS 再発治療薬・予防薬になり得ることを確認するものである。

E. 結論

MS 患者の末梢血リンパ球をフローサイトメ

ーターや DNA マイクロアレイで調べることによって、MS の病勢評価に有用なマーカー分子が同定された。NK 細胞 CD11c 発現量は、再発可能性を予測するバイオマーカーとして有用であり、MS 患者に対する適正な治療薬投与を可能にするものである。研究によって、新しい創薬の標的も明らかにされ、今後の研究の展開が大いに期待される場所である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 国内

| | |
|------------------|------|
| 口頭発表 | 30 件 |
| 原著論文による発表 | 0 件 |
| それ以外 (レビュー等) の発表 | 30 件 |

そのうち主なもの

論文発表

1. 荒浪利昌, 山村 隆: 多発性硬化症の病態免疫調節機構の破綻. 医学のあゆみ 219: 5047-5050, 2006
2. 荒浪利昌, 山村 隆: NK 細胞サブセットと難治性自己免疫疾患. 実験医学, 2007 (印刷中)
3. 佐藤準一: 網羅的遺伝子発現解析による多発性硬化症の病態・薬物反応性. 特集 II 遺伝子チップ解析の現状とその将来に期待される展開. 炎症と免疫 14: 205-216, 2006
4. 佐藤準一: 多発性硬化症のマイクロアレイ診断. 特集 II 多発性硬化症研究・治療の現状 2006. 神経研究の進歩 50: 582-599, 2006.

5. 佐藤準一: 多発性硬化症. インターフェロン治療学. 最新の基礎・臨床. 日本臨床 64: 1297-1309, 2006.
6. 三宅幸子: 多発性硬化症における免疫制御細胞の役割とその賦活法. 特集 II 多発性硬化症研究・治療の現状 2006. 神経研究の進歩 50: 636-643, 2006.

学会発表

1. 佐藤準一, 南里悠介, 土居芳充, 山村隆: IFN β 応答遺伝子群の網羅的解析: 副作用との関連性. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会. 名古屋, 2006. 3.2. (神経免疫学 14: 73, 2006).
2. 山村隆, 佐藤準一, 三宅幸子: 多発性硬化症研究の最前線と治療戦略. 第 79 回日本薬理学会年会. シンポジウム S3B1 進行性神経疾患の研究の最前線および治療の現状と創薬への展望. 横浜, 2006. 3.10.
3. 佐藤準一, 南里悠介, 土居芳充, 山村隆: Protein microarray による 14-3-3 結合タンパク質の網羅的解析. 第 47 回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5.12. (抄録集 199, 2006).
4. 南里悠介, 佐藤準一, 土居芳充, 山村隆: DNA microarray による MS 診断法・IFN β 治療効果予測法開発に関するアンケート調査. 第 47 回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5.13. (抄録集 285, 2006).
5. 佐藤準一: T 細胞の DNA マイクロアレイ解析による多発性硬化症の病型分類とインターフェロンベータ治療反応性. 第 15 回明治薬科大学オープンリサーチセンターセミナー. 東京, 2006. 7.13.

2) 海外

| | |
|---------|------|
| 口頭発表 | 36 件 |
| 論文による発表 | 31 件 |

そのうち主なもの
論文発表

1. Satoh, J-I., Y. Nanri, and T. Yamamura: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *J. Neurosci. Methods* 152: 278-288, 2006
2. Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, H. Onoue, T. Aranami, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Saito, M. Ohta, S. Miyake, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 174:108-118, 2006. Epub 2006 Mar 27.
3. Satoh, J-i., Y. Nanri, H. Tabunoki, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early interferon- β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes: an implication for IFN- β related adverse effects in multiple sclerosis. *BMC Neurology* 6:18, 2006
4. Miyamoto, K., S. Miyake, M. Mizuno, N. Oka, S. Kusunoki, and T. Yamamura: Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. *Brain* 129(Pt 8):1984-92. Epub 2006 Jul 10, 2006
5. Croxford, J.L., S. Miyake, Y-Y. Huang, M. Shimamura, and T. Yamamura: "Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7: 895 -897, 2006
6. Aranami, T., S. Miyake and T. Yamamura: Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177: 5659-5667, 2006
7. Satoh, J-i., H. Tabunoki, T. Yamamura, K. Arima, and H. Konno: TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in MS brains. *Neuropathol and Applied Neurobiol* 33:99-107, 2007
8. Onoue, H., J-i. Satoh, M. Ogawa, and T. Yamamura: Detection of anti-Nogo receptor autoantibody in the serum of multiple sclerosis

- and controls. *Acta Neurologica Scandin* 115:153-160, 2007
9. Yamamura, T.: Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift? *Current Rheumatology Reports* (in press), 2007
 10. Miyake, S. and T. Yamamura: NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (in press)
 11. Yamamura, T.: Invariant NKT cells and immune regulation in multiple sclerosis. In *Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease*. (Editor Jingwu Zhang). Springer, pp139-151, 2007
 12. Yamamura, T. and Aranami, T.: NK cells express a biomarker of multiple sclerosis CD11c. *Current Topics in Neuroimmunology*, Medimond Press, Italy, 2007 (in press)
 13. Satoh, J. Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In *Functional Protein Microarrays in Drug Discovery*. Edited by Predki PF. CRC Press, Boca Raton, FL, 2007 (ISBN: 0849398096).
 14. Hino, T., T. Yokota, S. Ito, K. Nishina, Y-S. Kang,, S. Mori, S. Hori, T. Kanda, T. Terasaki, and H. Mizusawa: In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 263-267, 2006.
 15. Fujita, T., N. Kambe, T. Uchiyama and T. Hori. Type I interferons attenuate T cell activating functions of human mast cells by decreasing TNF- α production and OX40 ligand expression while increasing IL-10 production. *J. Clin. Immunol.* 26:512-518, 2006.
 16. Kitawaki, T., N. Kadowaki, N. Sugimoto, N. Kambe, T. Hori, Y. Miyachi, T. Nakahata, and T. Uchiyama. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int. Immunol.* 18:1789-1799, 2006.
 17. Ogasawara, K. and L.L. Lanier: NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 25, 534-40, 2005
- 学会発表 (主なもの)
1. Doi, Y., S. Oki, J-i. Satoh, T. Aranami, S. Miyake, and T. Yamamura: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is over-expressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. Workshop 14. Pathogenesis of MS. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006
 2. Croxford, J.L., S. Miyake, M. Shimamura, and T. Yamamura: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. Oral Session 1B: CNS inflammation and regulatory mechanism. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 16, 2006
 3. Aranami, T., S. Miyake and T. Yamamura: CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. Oral Session 4B. Immunological Studies of MS (2). 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 16, 2006
 4. Satoh, J-i., H. Tabunoki, Y. Nanri, T. Yamamura, K. Arima, and H. Konno: Both aquaporin-1 (AQP1) and aquaporin-4 (AQP4) are expressed in cultured human astrocytes and non-hypertrophic astrocytes in brains of multiple sclerosis. Poster Session 11. MS-pathology and experimental models. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006
 5. Onoue, H., J-i. Satoh, M. Ogawa, and T. Yamamura: Anti-Nogo receptor autoantibody in the serum of multiple sclerosis. Poster Session 12. MS-immunological studies. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006
 6. Satoh, J-i., Y. Nanri, W. Sato, and T. Yamamura: DNA microarray analysis identifies CXCR3 and

CCR2 ligand chemokines as early IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes. 14. MS-therapy. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006

7. Nanri, Y., J-i. Satoh, W. Sato, and T. Yamamura: Questionnaire on the expediency of DNA microarray analysis for differential diagnosis of multiple sclerosis and prediction of therapeutic response to interferon-beta. 14. MS-therapy. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006
8. Satoh J: Nogo, Nogo receptor, and TROY expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. International Symposium: Alzheimer's disease, neurodegeneration and immunity. Nagoya, 2006.10.17. (Journal of Neuroimmunology 178: 21 IS03-05, 2006).
9. Satoh J: Microarray analysis clarifies the immunopathogenesis and therapeutic rationale for IFNB in MS. 8th International Congress of Neuroimmunology. Concurrent Symposium: Proteomics, transcriptomes and disease markers in MS. Nagoya, 2006.10.17.

Ⅱ. 知的所有権の取得状況

特許出願

国内特許取得 1 件

発明の名称：多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測方法

国内出願日 2002 年 6 月 28 日 (特願 2002-188932)

2006. 9. 22 登録 (特許番号 03856734)

国内出願 3 件

1) 発明の名称：多発性硬化症の再発予測法

国内出願 2006 年 4 月 7 日 (特願 2006-105825)

2) 発明の名称：I L-17 産生抑制物質及びそのスクリーニング方法

国内出願 2007 年 2 月 28 日 (特願 2007-49768)

3) 発明の名称：I L-17 に起因する炎症を改善するための医薬組成物

国内出願 2007 年 2 月 28 日 (特願 2007-49769)

2. 実用新案登録

なし

3. その他：GenBank 登録

1) Satoh J, Kuroda R, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 3, partial sequence, DNA Data Bank of Japan, AB280796, 2006.

2) Satoh J, Kuroda R, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 4, partial sequence, DNA Data Bank of Japan, AB280795, 2006.

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
(難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究)

平成 18 年度分担研究報告書

MS 寛解期ナチュラルキラー細胞 CD11c 発現量と疾患活動性に関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部 部長

研究協力者 荒浪利昌 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨 ナチュラルキラー (NK) 細胞は腫瘍細胞やウイルス感染細胞を殺すリンパ球であるが、迅速なサイトカイン産生を介して、様々な免疫反応に関与していることでも知られる。我々はいくつか、多発性硬化症 (MS) 寛解期に IL-5 産生能の亢進を特徴とする Type 2 NK 細胞が誘導され (Type2 NK 細胞偏倚)、調節性細胞として寛解の維持に積極的に関与している可能性を示してきた。最近、自己免疫疾患マウスモデルにおいて、樹状細胞マーカー CD11c 陽性で、特異な機能を持つ NK 細胞が同定され、調節性細胞である可能性が示唆された。しかしこれまで、ヒト自己免疫疾患における CD11c 陽性 NK 細胞に関する報告は無く、MS における重要性も不明である。本研究は、MS 寛解期の CD11c 陽性 NK 細胞の特徴を明らかにし、MS の病態における役割の解明を目的として解析を行った。その結果、MS 寛解期の NK 細胞では、健常者のそれに比べ、CD11c 発現量の有意な増加が認められた。NK 細胞 CD11c 発現量に従い、CD11c^{low} MS および CD11c^{high} MS に分けて比較したところ、CD11c^{high} MS の NK 細胞は HLA-DR を高発現しており、活性化状態にあることが示唆された。そこで、CD11c 発現量に対するサイトカインの影響を解析すると、MS の疾患活動性との関連が示唆される種々のサイトカインのうち、IL-15 或は IL-12+IL-18 のみが、NK 細胞 CD11c の有意な発現上昇を誘導した。機能的特徴として、CD11c^{low} MS の NK 細胞で認められた Type2 NK 細胞偏倚が、CD11c^{high} MS では認められなかった。さらに、CD11c^{high} MS は、採血より 4 ヶ月間の寛解率が、CD11c^{low} MS に比べ有意に低いことが判明した。以上より、MS 寛解期の NK 細胞 CD11c 発現上昇は、Type2 NK 細胞偏倚の消失を示唆し、MS の疾患活動性増強を反映すると考えられる。NK 細胞の CD11c は、MS の病勢評価、再発予知、治療方針決定などに有用なバイオマーカーの一つとなり得ると考えられる。

A. 研究目的

ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) は、腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対してプライミングなしに細胞傷害活性を示す、リンパ球である。また、NK 細胞は、様々な免疫反応において、迅速なサイトカイン産生のソースとして働き、免疫反応の方向性を左右する細胞としても重要

であることが知られている。

エフェクター T 細胞が、Th1、Th2 細胞へと分化するのと同様、近年、ヒト NK 細胞も、サイトカイン産生能の異なる、type1 および type2 NK 細胞へと分化しうることが報告された¹。IFN- γ 産生性の type1 NK 細胞は、IL-12 により誘導され、IL-5、IL-13 産生性 type2 NK

細胞は IL-4 により分化が誘導される。我々は寛解期多発性硬化症 (MS) 患者より分離した NK 細胞が、健常者のそれに比べて、IL-5 産生増加を示し、IL-12R β 2 の発現が低い、という特徴を有する事を見出した^{2,3}。このような特徴は、type2 NK 細胞のそれに合致し、我々はこれを寛解期 MS における type2 NK 細胞偏倚として提唱した。このような type2 NK 細胞偏倚は、MS の再発時には消失しており、以上から、NK 細胞が自己反応性 Th1 細胞に対して制御性細胞として働き、寛解期の維持に関与していると考えている。

最近マウスにおいて樹状細胞 (DC) マーカーである、CD11c を発現する NK 細胞が、特異な機能を持つ、新たな NK 細胞サブセットとして同定された⁴。この細胞は、bitypic NK/DC 細胞と呼ばれ、抗原提示能と細胞傷害活性を併せ持ち、自己免疫マウスモデルにおいて制御性細胞として働くことが示唆された。しかしこれまで、ヒト自己免疫疾患における、CD11c 陽性 NK 細胞の機能は不明であった。本研究において我々は、MS 寛解期における CD11c 陽性 NK 細胞の細胞表面分子の表現型、機能解析を行い、MS の病態における、この細胞の役割を検討した⁵。

B. 研究方法

#1. 対象として、健常者 10 例と再発寛解型 MS 患者 25 例の末梢血単核球 (PBMC) を用いた。全ての MS 患者は、採血の時点で最低 1 ヶ月間免疫抑制剤 (ステロイド、IFN- β) 投与を受けていないことを条件とした。

#2. 比重遠心分離法にて得た PBMC を蛍光色素標識抗 CD3, CD56, CD11c 抗体で染色し、CD3 陰性 CD56 陽性 NK 細胞上の CD11c 発現をフローサイトメトリーにより測定した。

#3. CD11c 発現上昇のメカニズムを明らかにするため、健常者の精製 NK 細胞を様々なサイトカイン存在下で 3 日間培養し、CD11c 発現量を解析した。

#4. 健常者、MS 患者それぞれから末梢血 NK 細胞を磁気ビーズを用いて分離し、定量的 RT-PCR 法により、IFN- γ , IL-5 発現量を定量、Type2 NK 細胞偏倚を評価した。

#5. 採血より 120 日間の患者の臨床経過を追跡し、Kaplan-Meier の生存率に倣い、寛解率を算出した。統計学的検定は、Logrank テストで行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立精神・神経センター倫理委員会の承認を受けており、また、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は、当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

C. 研究結果

#1. MS 寛解期の NK 細胞では、健常者に比べ、CD11c 発現量 (平均蛍光強度、MFI) の有意な増加が認められた。MS 寛解期は、健常者 MFI の、(平均値 + 2x 標準偏差) を正常上限とすると、CD11c^{CD11c^{low}} MS および CD11c^{high} MS に分けられた。

#2. NK 細胞の代表的活性化マーカーである、HLA-DR 発現を解析したところ、CD11c^{high} MS の NK 細胞において、健常者、CD11c^{low} MS の NK 細胞に比べて、有意な発現増強が認められた。

#3. MS の疾患活動性との関連が示唆される種々のサイトカインのうち、IL-15 或は IL-12+IL-18

のみが、NK 細胞 CD11c の有意な発現上昇を誘導した。

#4. CD11c^{low} MS の NK 細胞では、Type2 NK 細胞偏倚が認められたが、CD11c^{high} MS では、認められなかった。

#5. CD11c^{high} MS は、4ヶ月間の寛解率が、CD11c^{low} MS に比べ有意に低いことが判明した。

#6. 寛解期に発現が上昇した CD11c は、再発時には有意に低下しており、NK 細胞 CD11c が MS の病態に従って、ダイナミックに変動することを示唆する。

D. 考察

#1. CD11c 発現上昇のメカニズムについては、NK 細胞活性化マーカー発現が、CD11c^{high} MS において有意に増強していること、また IL-15, IL-18, IL-12 によって CD11c 発現上昇が誘導されたことから、自己免疫反応の増強に伴って産生が増加した、これら炎症性サイトカインの刺激により、CD11c^{high} MS の NK 細胞における CD11c 発現上昇が誘導された可能性が考えられる。

#2. 上記の炎症性サイトカインの、NK 細胞 IL-5 発現に対する影響を解析したところ、これらの炎症性サイトカインにより NK 細胞の IL-5 発現は有意に低下した（データ示さず）。このことから、炎症性サイトカインの刺激により、NK 細胞 CD11c の発現上昇と Type2 NK 細胞偏倚の消失が誘導された可能性が考えられた。

#3. 重要なことに、このような NK 細胞の変化と MS の臨床経過の間に強い関連が見出された。CD11c^{high} MS の NK 細胞における Type2 NK 細胞偏倚の消失が、この群の早期の再発の一因となっている可能性が示唆された。

E. 結論

NK 細胞 CD11c は、MS の病態に従って、ダイナミックに変動し、寛解期の疾患活動性を反映することが示唆される。このような特徴から、MS の病勢評価、治療方針決定などに有用なバイオマーカーの一つとなり得ると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1) 国内

論文発表

1. 荒浪利昌, 山村 隆: 多発性硬化症の病態免疫調節機構の破綻. 医学のあゆみ 219: 5047-5050, 2006
2. 荒浪利昌, 山村 隆: NK 細胞サブセットと難治性自己免疫疾患. 実験医学, 2007 (印刷中)

2) 海外

論文発表

1. Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, H. Onoue, T. Aranami, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Saito, M. Ohta, S. Miyake, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 174:108-118, 2006. Epub 2006 Mar 27.
2. Satoh, J-i., Y. Nanri, H. Tabunoki, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early interferon- β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes: an implication for IFN- β related adverse effects in multiple sclerosis. *BMC Neurology* 6:18, 2006
3. Croxford, J.L., S. Miyake, Y-Y. Huang, M. Shimamura, and T. Yamamura: "Invariant V α 19i

T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7: 895-897, 2006

4. Aranami, T., S. Miyake and T. Yamamura: Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177: 5659-5667, 2006
5. Yamamura, T.: Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift? *Current Rheumatology Reports* (in press), 2007
6. Miyake, S. and T. Yamamura: NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (in press)
7. Yamamura, T.: Invariant NKT cells and immune regulation in multiple sclerosis. In *Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease*. (Editor Jingwu Zhang). Springer, pp139-151, 2007
8. Yamamura, T. and Aranami, T.: NK cells express a biomarker of multiple sclerosis CD11c. *Current Topics in Neuroimmunology*, Medimond Press, Italy, 2007 (in press)

学会発表

1. Doi, Y., S. Oki, J-i. Satoh, T. Aranami, S. Miyake, and T. Yamamura: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is over-expressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. Workshop 14. Pathogenesis of MS. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006
2. Croxford, J.L., S. Miyake, M. Shimamura, and T. Yamamura: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells

promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. Oral Session 1B: CNS inflammation and regulatory mechanism. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 16, 2006

3. Aranami, T., S. Miyake and T. Yamamura: CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. Oral Session 4B. Immunological Studies of MS (2). 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 16, 2006
4. Satoh, J-i., Y. Nanri, W. Sato, and T. Yamamura: DNA microarray analysis identifies CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes. 14. MS-therapy. 8th International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2006), Nagoya, October 18, 2006

Ⅲ. 知的所有権の取得状況

特許出願

国内特許取得 1 件

発明の名称：多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測方法
国内出願日 2002年6月28日 (特願 2002-188932)

2006.9.22 登録 (特許番号 03856734)

2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

MS 再発寛解期の末梢血 T リンパ球で発現差異を呈する遺伝子群の 分子ネットワーク解析

佐藤 準一、三澤 多真子、天竺桂 弘子

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科 バイオインフォマティクス

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。もし事前に再発を予知出来れば、再発前から免疫調節薬を集学的に投与して、炎症を軽減し軽症化出来る可能性が高い。しかしながら現在まで MS 再発予測法は確立されていない。MS の寛解期と再発期では末梢血 T リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。本研究では MS 患者の末梢血 T リンパ球遺伝子発現プロファイルを経時的に解析し、再発期特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)発現パターンを同定することを目的とする。6名の再発寛解型 MS(relapsing-remitting MS; RRMS)患者で、急性増悪期と完全寛解期に末梢血リンパ球を採取、CD3⁺ T 細胞から RNA を精製、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを比較解析し 43 RSG を同定した。43 RSG を指標とする階層的クラスター解析で、再発期サンプルクラスターと寛解期サンプルクラスターを遺伝子発現プロファイル上、識別することが出来た。すなわち 43 RSG は MS 再発をモニターするバイオマーカーとなり得ると考えられた。バイオインフォマティクスの新しいデータマイニングツールである KeyMolnet による 43 RSG の分子ネットワーク解析で、NF- κ B 遺伝子発現制御系異常の MS 再発への関与が示唆された。NF- κ B は炎症性サイトカイン発現制御をコントロールする中心的な転写因子である。従って NF- κ B 制御適正化分子は MS 再発治療薬・予防薬の創薬ターゲットとなり得る。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間

的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することによ

り髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。インターフェロンベータ(IFN β)はMS再発を有意に抑制するが、顕著な神経保護作用は見られない。もし事前に再発を予知出来れば、再発前から神経保護作用のある脳循環・代謝改善薬や免疫抑制薬を集学的に投与して、炎症を軽減し軽症化出来る可能性が高い。

しかしながら現在までMS再発予測法は確立されていない。MS寛解期と再発期では末梢血Tリンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。本研究ではこの仮説に基づき、MS患者の末梢血Tリンパ球遺伝子発現プロフィールを経時的にDNAマイクロアレイで解析し、再発期特異的遺伝子(relapse-specific gene; RSG)発現パターンの同定を試みた。

B. 研究方法

国立精神・神経センター武蔵病院神経内科の6名の再発寛解型MS(relapsing-remitting MS; RRMS)患者で、神経内科専門医の診断に基づく急性増悪期(acute relapse)と完全寛解期(remission)に末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を採取、MACSでCD3⁺T細胞を分離、RNAを精製、cDNA microarray(1258 genes; Hitachi Life Science)を用いて、遺伝子発現プロフィールを比較解析した。再発期サンプルと寛解期サンプルの2群における個々の遺伝子発現レベル差異をStudent t-testで検定し、RSGを抽出した。生物情報統合プラットフォームKeyMolnet(医薬分子設計研究所)で43 RSG

の分子ネットワークを、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索法(neighboring search)と発現制御に関連する転写因子群を調べる共通上流検索法(common upstream search)で解析した。

(倫理面への配慮)

「多発性硬化症患者および対照リンパ球遺伝子発現解析研究(申請者山村隆)」は、既に国立精神・神経センター倫理委員会で承認済みである。本研究で解析する患者全員から研究参加に関して文書で同意を取得した。

C. 研究結果

#1.再発期サンプル(n = 6) vs 寛解期サンプル(n = 6)の群間検定(p < 0.05)で43遺伝子(RSG)の発現差異(再発期に上昇18遺伝子; 再発期に低下25遺伝子)を認めた(Table 1)。

#2. 43 RSGを指標(discriminator)とした階層的クラスタ解析で、再発期サンプルと寛解期サンプルを独立したクラスタに分離することが出来た。

#3. KeyMolnetで43 RSGから88 core contentsを抽出し、分子ネットワーク解析を施行した(Fig. 1)。共通上流検索と周辺検索の両方で、再発におけるNF- κ B発現制御系の関与が最も有意と判定された。

D. 考察

RRMSの末梢血Tリンパ球で再発期 vs 寛解期に発現差異を認める43遺伝子群(RSG)を同定

した。43 RSG は MS 再発をモニターするバイオマーカーとなり得る。43 RSG の分子ネットワーク解析により、NF- κ B 遺伝子発現制御系異常の MS 再発への関与が示唆された。NF- κ B は TNF α , IL-1 など炎症性サイトカイン発現制御で中心的役割を果たす転写因子である。一方 TNF α , IL-1 は NF- κ B の発現上昇を誘導し、positive feedback loop を形成して炎症を遷延化させる(Barnes and Karin. NEJM 336: 1066-1071, 1997)。現在まで 150 種類以上の遺伝子が NF- κ B ターゲットとして同定されている (Pahl. Oncogene 18: 6853-6866, 1999)。NF- κ B selective inhibitor である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in vivo 投与(Pahan et al. Neurosci Lett 287: 17-20, 2000)や脳特異的 NF- κ B 発現抑制 (Van Loo et al. Nature Immunol 7: 954-961, 2006) は MS 動物モデル EAE を軽症化する。従って NF- κ B 制御適正化分子は MS 再発治療薬・予防薬の創薬ターゲットとなり得る。

E. 結論

MS 患者再発期と寛解期の末梢血 T リンパ球の DNA マイクロアレイ解析により、NF- κ B 発現制御系に関連し、再発予測指標となり得る 43 RSG を同定した (Satoh et al. Neuroscience Research, submitted)。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 152: 278-288, 2006.
2. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology* 174: 108-118, 2006.
3. Satoh J, Nanri Y, Tabunoki H, Yamamura T: Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes: an implication for IFN β -related adverse effects in multiple sclerosis. *BMC Neurology* 6: 18-34, 2006.
4. Satoh J, Tabunoki H, Nanri Y, Arima K, Yamamura T: Human astrocytes express 14-3-3 sigma in response to oxidative and DNA-damaging stresses. *Neuroscience Research* 56: 61-72, 2006.
5. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H. TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33: 99-107, 2007.
6. Kuroda R, Satoh J, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K. A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola